

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790723

研究課題名(和文) カルシウムを中心とした心不全発症の分子機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) The molecular mechanism focused on calcium in pathogenesis of heart failure and its clinical application.

研究代表者

武田 理宏 (TAKEDA TOSHIHIRO)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70506493

研究成果の概要(和文)：

Ryanodine receptor (RyR2)は興奮収縮連関を担う代表的な蛋白質で、多くの結合蛋白質によりその機能は制御される。SorcinはRyR2結合蛋白質の一つであり、in vivoではRyR2のチャネル活性を抑制する。In vivoでのsorcinの役割を明らかとするため、sorcin欠損マウス(SOKO)を作成した。SOKOは正常に発育し、その心筋細胞内カルシウム動態には影響を認めなかった。圧負荷心ではsorcinの発現は上昇する。圧負荷心においてSOKOと野生型マウスは心肥大の程度ならびに心機能に有意差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：

In the heart, calcium plays important roles in excitation-contraction (E-C) coupling. SERCA2a and ryanodine receptor (RyR2) are two major  $Ca^{2+}$  signaling proteins involving in E-C coupling. The activity of these proteins is regulated by their accessory proteins, which may play an important role in the pathogenesis of heart failure. Sorcin is the one of the protein that is associated with RyR2

The expression level of sorcin was altered in remodeling hearts. In order to elucidate a role of sorcin in the heart, we generated sorcin knockout mice. The mice showed no abnormal E-C coupling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、カルシウム、興奮収縮連関、ノックアウトマウス

## 1. 研究開始当初の背景

心筋においてカルシウムイオンは興奮収縮連関のセカンドメッセンジャーとして中心的な役割を果たしているだけでなく、心筋肥大や心筋細胞死の情報伝達物質としても重要である。

心臓の興奮収縮連関では、筋小胞体に存在する ryanodine receptor (RyR2)からのカルシウムの細胞質への放出、筋小胞体カルシウムポンプ (SERCA)による筋小胞体へのカルシウム再取り込みが行われる。RyR2やSERCAは、その機能を調節する多くの結合蛋白質が

存在することが知られている。これらの蛋白質は、肥大心や不全心では、その発現や RyR2、SERCA への結合を変えることで心機能に影響を与える事が報告されている。

この様に筋小胞体修飾蛋白質の研究は健康心での興奮収縮連関のメカニズムの解明に加え、慢性心不全の病態解明に必須である。

Sorcina は Penta-EF-hand を持つカルシウム結合蛋白質で、in vitro で RyR2 のチャンネル活性を抑制することが知られている。しかしながら、生体内での sorcin の働きは未だ明らかでなく、心筋に sorcin を過剰発現したトランスゲニックマウスは心筋収縮力の低下を認めるとの報告がある一方、アデノウイルスを用いたラビット生体心筋に sorcin を過剰発現すると心収縮力の亢進を認めると報告されている。この表現系の違いは実験に使用した種の違いである可能性もあるが、sorcin の発現量によるものである可能性がある。すなわち、トランスゲニックマウスでの強発現系では心機能は抑制的に、アデノウイルスを用いた sorcin の発現では、その発現がトランスゲニックマウスよりは少なく、心機能に促進的に働いていると考察される。

病態モデルで sorcin の発現量が変化しているか検討するために、マウス圧負荷心モデルで sorcin の発現を検討したところ、心肥大期に sorcin の蛋白質発現が上昇することを発見した。これらの事は、sorcin の発現量の変化が心機能制御に非常に重要な働きをしていることを示唆している。

これらの問題を明らかにするために、我々は sorcin 欠損マウス (SOKO) を作成した。

## 2. 研究の目的

本研究では SOKO を用い、心臓超音波法、心臓カテーテル法での心機能の評価やアダルト単離心筋を用いた心筋 Ca 動態を測定し、sorcin の心臓興奮収縮連関における役割を検討する。次に圧負荷心不全モデルを用い、sorcin が心肥大、心不全進展に与える影響を検討し、sorcin の発現量の変化の意義を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの心臓の形態学的、組織学的評価

マウスの心臓の評価は心臓超音波法を用いて行った。左室拡張末期径、左室収縮末期径、中隔壁厚、左室後壁厚を計測し、左室短縮率は左室拡張末期径と左室収縮末期径の差を左室拡張末期径で除す事により求めた。

心筋細胞横断面積や心筋の線維化の程度は、パラホルムアルデヒドで固定した心筋をパラフィン固定し、HE 染色、Azan-Mallory 染色にて観察した。

### (2) マウスの心臓の生化学的評価。

RyR2 や SERCA2a、他のカルシウム修飾蛋白質の発現は、ウエスタンブロット法にて検討を行った。

### (3) 観血的手法を用いた心機能の評価

マウスを麻酔下で心尖部より圧カテーテルを挿入し、観血的血行動態測定の測定を行った。圧の測定は左室収縮期圧、左室拡張末期圧、収縮能の指標である dp/dt max、拡張の指標である dp/dt min について行った。

さらに、マウスの心摘出時に心重量、左室重量を測定し、マウスの体重で補正する事で、心筋肥大の程度について検討を行った。

### (4) 心筋カルシウムトランジェントの評価

成獣マウスの心筋をランゲンドルフ法にて、コラゲナーゼを用いて単離を行った。カルシウム指示薬である Fura-2 を単離心筋細胞に負荷し、細胞外カルシウム濃度を 1mM の条件下で、0.25Hz の刺激を加え、心筋のカルシウムトランジェントを測定した。

### (5) マウス心圧負荷モデルの作成

マウス横行大動脈を縮窄する事により、マウス心臓に圧負荷をかけ、1週間後に心筋細胞肥大の程度や心機能について評価を行った。圧負荷の程度はマウスの右前腕と左前腕の血圧の圧格差を計測する事により求めた。

## 4. 研究成果

### (1) 定常状態での sorcin の役割

#### ① カルシウム修飾蛋白質の発現

SOKO はメンデルの法則に従い誕生し、正常に発育し、外見上は大きな異常は認めなかった。ウエスタンブロット法で sorcin がノックダウンされている事が確認されたが、RyR2、SERCA2a、phospholamban (PLN) の蛋白質発現、PLN のリン酸化 (p-PLN) の程度に差を認めなかった (図 1)。

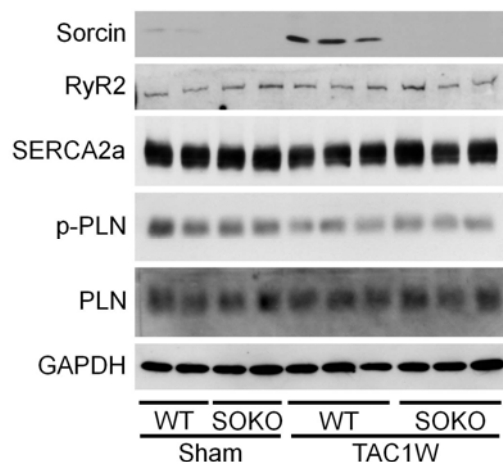


図 1. カルシウム修飾蛋白質の発現

### ②心筋細胞肥大と心筋線維化

Hematoxylin-Eosin染色やAzan-Mallory染色を用いた組織学的検討では線維化を含む異常は認めなかった。心筋横断面積は野生型マウス(WT)で同等であり、心筋細胞肥大は認めなかった。また、体重で補正した心重量(WT:  $4.53 \pm 0.12$  mg/g, SOKO:  $4.39 \pm 0.14$  mg/g)、左室重量(WT:  $3.36 \pm 0.11$  mg/g, SOKO:  $3.20 \pm 0.10$  mg/g)は両群で差を認めなかった。これらの事より、sorcinのノックダウンは心肥大や心筋の線維化には影響を与えない事が明らかとなった。

### ③マウス心機能評価

心臓超音波法を用いた検討では、左室拡張末期径(WT:  $3.50 \pm 0.03$  mm, SOKO:  $3.47 \pm 0.03$  mm)、収縮末期径(WT:  $1.97 \pm 0.06$  mm, SOKO:  $1.96 \pm 0.05$  mm)、左室短縮率(WT:  $43.8 \pm 1.5$  %, SOKO:  $43.5 \pm 1.3$  %)、左室壁厚(中隔; WT:  $0.76 \pm 0.02$  mm, SOKO:  $0.78 \pm 0.02$  mm、後壁; WT:  $0.72 \pm 0.01$  mm, SOKO:  $0.75 \pm 0.01$  mm)に両群で差を認めなかった。

心機能を更に検討を行うため、観血的に左室内の圧を計測した。左室収縮期圧(WT:  $80.6 \pm 4.3$  mmHg, SOKO:  $82.9 \pm 5.8$  mmHg)、左室拡張末期圧(WT:  $0.93 \pm 0.44$  mmHg, SOKO:  $1.00 \pm 0.55$  mmHg)、収縮能の指標である dp/dt max (WT:  $8028 \pm 890$  mmHg/sec, SOKO:  $7229 \pm 1189$  mmHg/sec)、拡張の指標である dp/dt min (WT:  $-4971 \pm 704$  mmHg/sec, SOKO:  $-5143 \pm 557$  mmHg/sec)、いずれの指標も両群間で差を認めなかった。

### ④心筋カルシウムトランジェント

マウス成獣単離心筋細胞を用い、心筋のカルシウム動態の検討を行った(図2)。最大カルシウムトランジェント(WT:  $0.383 \pm 0.013$ , SOKO:  $0.364 \pm 0.012$ )とカルシウムトランジェントがPeak Caの3/4から1/4に達する時間であるDecay time(WT:  $0.267 \pm 0.048$  sec, SOKO:  $0.237 \pm 0.021$  sec)に両群で有意差は認めなかった。

以上より、sorcinのノックダウンはマウスの定常状態における心機能、カルシウム動態には影響を与えていないことが明らかとなった。

## (2)心肥大期の sorcin の役割

### ①マウス横行大動脈縮窄の施行

マウス横行大動脈(TAC)を縮窄した圧負荷心では、心肥大期に sorcin の発現が上昇する(図1)。そこでSOKOに対し、TACを施行した。TACにより生じた圧格差はWTが $55.2 \pm 5.5$  mmHg、SOKOが $51.0 \pm 3.8$  mmHgであり、両群間で有意差を認めなかった。

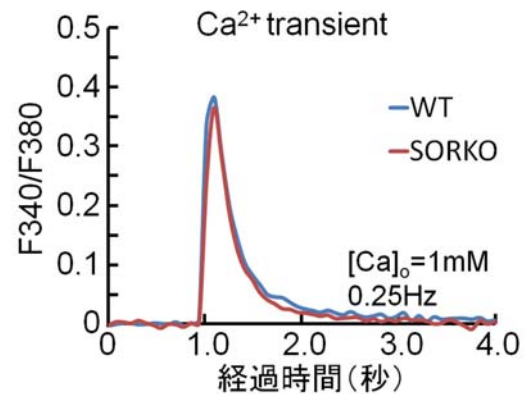


図2. マウス成獣心筋細胞のカルシウムトランジェント

### ②マウス圧負荷心筋におけるカルシウム修飾蛋白質の発現

TAC施行後1週間で、WT、SOKO共にsham手術群に比しp-PLNの減少を認めたが、WTとSOKOでカルシウム修飾蛋白質の発現に差を認めなかった(図1)。

### ③心肥大期のマウス心機能

TAC後1週間の心エコーでは、WT、KO共にsham手術群に比しTAC群は有意な壁厚の増大を認めたが、WT TAC群、SOKO TAC群間でその程度に有意差を認めなかった(中隔; WT sham:  $0.75 \pm 0.01$  mm, WT TAC:  $1.01 \pm 0.03$  mm, SOKO sham:  $0.73 \pm 0.02$  mm, SOKO TAC:  $1.05 \pm 0.06$  mm、後壁; WT sham:  $0.70 \pm 0.02$  mm, WT TAC:  $0.97 \pm 0.02$  mm, SOKO sham:  $0.71 \pm 0.02$  mm, SOKO TAC:  $0.99 \pm 0.02$  mm)。また、左室拡張末期径(WT sham:  $3.51 \pm 0.05$  mm, WT TAC:  $3.47 \pm 0.05$  mm, SOKO sham:  $3.40 \pm 0.06$  mm, SOKO TAC:  $3.28 \pm 0.06$  mm)、左室収縮末期径(WT sham:  $1.87 \pm 0.06$  mm, WT TAC:  $2.00 \pm 0.06$  mm, SOKO sham:  $1.85 \pm 0.05$  mm, SOKO TAC:  $1.78 \pm 0.08$  mm)、左室短縮率(WT sham:  $46.7 \pm 1.4$  %, WT TAC:  $42.1 \pm 1.46$  %, SOKO sham:  $45.6 \pm 1.1$  %, WT TAC:  $46.0 \pm 1.6$  %)はWT TAC群、SOKO TAC群共に有意差はなく、心拡大や心機能の低下を認めなかった。

### ④圧負荷心の心筋細胞肥大の評価

Hematoxylin-Eosin染色やAzan-Mallory染色を用いた組織学的検討では、SOKO TAC群はWT TAC群に比し有意な線維化の亢進や、心筋細胞肥大は認めなかった。また、体重(WT sham:  $26.1 \pm 1.1$  g, WT TAC:  $25.2 \pm 0.3$  g, SOKO sham:  $24.4 \pm 1.1$  g, SOKO TAC:  $26.3 \pm 0.4$  g)で補正した心重量(WT sham:  $4.83 \pm 0.11$  mg/g, WT TAC:  $6.34 \pm 0.18$  mg/g, SOKO sham:  $4.65 \pm 0.13$  mg/g, SOKO TAC:  $6.29 \pm 0.28$  mg/g)、左室重量(WT sham:  $3.52 \pm 0.07$  mg/g, WT TAC:  $4.80 \pm 0.14$  mg/g, SOKO sham:  $3.40 \pm 0.11$  mg/g, SOKO TAC:  $4.77 \pm 0.17$

mg/g) は sham 手術群に比し、TAC 手術群で増大を認めるものの、WT TAC、SOKO TAC 両群で有意差を認めなかった。

#### ④ 圧負荷心のカルシウムトランジェント

心肥大期の心筋を単離し、心筋のカルシウム動態の検討を行った。最大カルシウムトランジェント (WT sham:  $0.326 \pm 0.025$ , WT TAC:  $0.282 \pm 0.016$ , SOKO sham:  $0.317 \pm 0.026$ , SOKO TAC:  $0.359 \pm 0.016$ ) と Decay time (WT sham:  $0.295 \pm 0.041$  sec, WT TAC:  $0.218 \pm 0.028$  sec, SOKO sham:  $0.284 \pm 0.017$  sec, SOKO TAC:  $0.262 \pm 0.015$  sec) に 4 群間で有意差は認めなかった (図 3)。

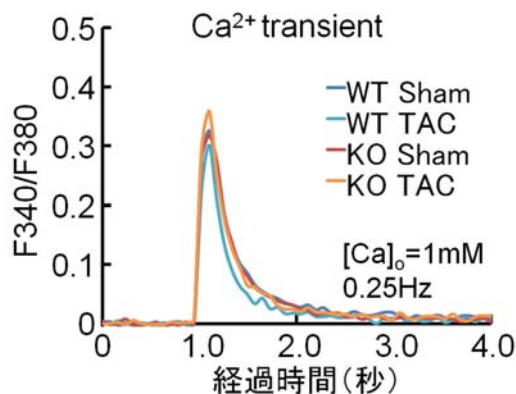


図 3. TAC 施行後のマウス成獣心筋細胞のカルシウムトランジェント

以上より、sorcin のノックダウンはマウスの定常状態だけでなく、病的肥大期においても心機能、カルシウム動態には影響を与えていないことが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy*, 査読有, 6, 2010.
- ② Yokoe S, Asahi M, Takeda T, Otsu K, et al. Inhibition of phospholamban phosphorylation by O-GlcNAcylation: implications for diabetic cardiomyopathy. *Glycobiology*, 査読有, 20, 1217-1226, 2010.
- ③ Mizote I, Yamaguchi O, Hikoso S, Takeda T, et al. Activation of MTK1/MEKK4 induces cardiomyocyte death and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 査読有, 48, 302-309, 2010.
- ④ Hikoso S, Yamaguchi O, Nakano Y, Takeda T, et al. The I·B kinase ·/nucle

ar factor ·B signaling pathway protects the heart from hemodynamic stress mediated by the regulation of manganese superoxide dismutase expression. *Circulation Research*, 査読有, 105, 70-79, 2010.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 武田 理宏 Allosteric Modulation of Hemoglobin is the New Therapeutic Target for Improving Exercise Capacity in Patients with Chronic Heart Failure. 第 26 回国際心臓研究学会日本部会 2009 年 12 月 5 日 札幌
- ② 武田 理宏 ヘモグロビン酸素親和性に着目した心不全患者運動耐容能改善の試み 第 13 回 日本心血管内分泌代謝学会 2009 年 10 月 23 日 大宮
- ③ 武田 理宏 Reduction in Hemoglobin-Oxygen Affinity Results in the Improvement of Exercise Capacity in Mice with Chronic Heart Failure. 第 36 回国際生理学会世界大会 2009 年 7 月 30 日 京都

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 理宏 (TAKEDA TOSHIHIRO)  
大阪大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 70506493